Klebsiella pneumoniae CICC10011 发酵产 2,3-丁二醇的工艺研究

樊亚超[1]，张霖，李晓姝，王鹏翔，姚新武，乔凯

（中国石油化工股份有限公司 大连石油化工研究院，大连 116000）

摘要： 2,3-丁二醇应用广泛，是一种潜在的平台化合物，可以用于替代传统平台化合物-四碳烃。基于能源安全及绿色环保的需求，生物炼制制备 2,3-丁二醇受到人们的青睐。与化学法相比，生物炼制制备 2,3-丁二醇具有明显的优势。因此，开发合适的 2,3-丁二醇发酵工艺是实验室研究的重点。针对菌种 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011，研究人员对菌种发酵产 2,3-丁二醇的性质进行了初步考察，并通过控制不同的发酵条件，研究了 pH、通空气量和转速在发酵过程中对菌种代谢的影响，从而确定了菌种发酵产 2,3-丁二醇的工艺条件。发酵过程中，pH、通空气量以及转速均采用两段调控。在前 12h 菌种生长阶段，控制 pH 6.8，通空气量 1.0vvm，转速 400rpm，转发酵之后控制发酵条件为 pH 6.0，通空气量 0.5vvm，转速 300rpm。

关键词： 2,3-丁二醇；发酵工艺；两段调控

中图分类号： TQ923 **文献标志码：** A **文章编号：**

Study On The Fermentation Of 2,3-Butanediol By *Klebsiella pneumoniae* CICC10011

FAN Ya-chao, ZHANG Lin, LI Xiao-shu, WANG Peng-xiang, YAO Xin-wu, QIAO Kai

（Dalian Research Institute of Petroleum and Petrochemicals, SINOPEC, Dalian 116000, Liaoning, China）

Astract: 2,3-butanediol is used widely. As a potential platform compound, it can be used to replace the traditional platforms – four carbon hydrocarbons. With the requirements of energy security and environmental protection, biological refining 2,3-butanediol gets the substantial interest of researchers, which has obvious advantages over chemical method. Therefore, it is important to develop the suitable fermentation process of 2,3-butanediol. With the strain *Klebsiella pneumoniae* CICC10011, a preliminary study on the properties of 2,3-butanediol fermentation was carried out. By changing conditions, researchers studied the effects of pH, air flow rate and rotating speed on the metabolism of the stain. In this way, the better fermentation conditions for producing 2,3-butanediol were geted. In the process, pH, air flow rate and rotating speed were controlled through two-stages. In the first 12h, we kept the pH 6.8， the air flow rate 1.0vvm and the rotating speed 400rpm. Then, we changed them to 6.0, 0.5vvm and 300rpm, respectively.

Key words: 2,3-butanediol; the process of fermentation; two-stages controlling

随着社会经济的快速发展，传统能源物质的日益枯竭，人类社会面临环境污染、资源短缺等问题，生存环境日益恶化[1,2]。生物炼制技术以其绿色、过程条件温和以及原材料可再生的工艺特性受到人们的青睐，符合现代人对可持续发展的诉求，是现代化工发展的主要方向之一，成为各国发展战略的重要组成部分[1-3]。在众多的生物炼制产品中，2,3-丁二醇因为其广泛的用途以及未来潜在的应

[1]通讯作者，电子信箱：E-mail: fanyachao.fshy@sinopec.com。

用价值受到人们的高度关注，而化学法生产 2,3-丁二醇由于其特殊的结构特性使生产过程需严苛的条件，造成了工艺条件复杂、操作困难、成本高昂，难以实现大规模的工业化生产，这也直接造成了对 2,3-丁二醇的应用研究不够充分[4]。与化学法相较，生物炼制制备 2,3-丁二醇优势明显[5]。

2,3-丁二醇是一个典型的大宗化学品，广泛应用于化工、食品、燃料及航空航天等领域。寻求经济，高效和低污染的 2,3-丁二醇制备方式并最终将其产业化一直是各国科学研究的热点，早在 1906 年 Harden and Walpole[6]就利用 *Klebsiella pneumoniae* 生产 2,3-BDO。随后，随着研究的不断深入，生物法发酵制备 2,3-丁二醇已经取得了众多的研究成果，有多篇文献总结了 2,3-丁二醇发酵工艺研究进展[1-5]，也有文献[7]总结了近年来微生物合成 2,3-BDO 的菌种改造和构建技术，这也是未来生物法制备 2,3-BDO 的重要方向之一。2,3-丁二醇发酵工艺受到多种因素的影响和制约，其中主要的因素有底物种类和浓度、pH 值、溶氧以及发酵方式等。其中，2,3-丁二醇的发酵过程是一个多副产物形成的过程，在不同的 pH 条件下，有利于不同副产物的形成。有机酸在碱性条件下易于生成，而 2,3-丁二醇则易于在酸性条件下生成[8,9]。溶氧是 2,3-丁二醇发酵最重要的操作条件。碳源的流向随着溶氧的变化而改变，不同的溶氧，产物的转化率和产量也不相同。高溶氧有利于菌体的生长，而低溶氧有利于 2,3-丁二醇的合成[10]。

本文根据 2,3-丁二醇菌种发酵的特点，初步考察了菌种 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 发酵产 2,3-丁二醇的特性，通过调控影响发酵工艺的关键因素，确定了发酵的优化工艺条件。

1 材料与方法

1.1 实验装置与材料

高效液相色谱，Waters 2695；示差折光检测器，Waters 2414；离心机；pH 计；磁力搅拌器；5L、15L 发酵罐等。

菌种 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 由南京工业大学提供。

种子培养基为（g/L）：葡萄糖，20.0；酵母膏，3.0；蛋白胨，10.0；氯化钠，10.0。调节培养基的 pH 为 7.0[11]。

发酵培养基为（g/L）：葡萄糖，80.0；玉米浆干粉，19；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.4g/L；$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$，13.7；KH_2PO_4，2.0；$(NH_4)_2HPO_4$，3.3；$(NH_4)_2SO_4$，6.6；$FeSO_4 \cdot 7H_2O$，

0.05；$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，0.001；$MnSO_4 \cdot 4H_2O$，0.001.调节培养基 pH 值为 6.8[12]。

种子培养基和发酵培养基均在 115℃下灭菌 30min，其中 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 配置成为溶液，并用无菌滤膜过滤备用。

1.2 实验方法

（1）菌种活化

斜面保藏的菌种 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 转接种子培养基活化。接 1 环保藏的菌种于装有 100mL 种子培养基的三角瓶中，在 200rpm，37℃的台式恒温摇床中，培养 15h 获得活化种子细胞。

（2）种子培养

将活化的菌种以 10%的接种量，接入到装有种子培养基的三角瓶中，在 200rpm，37℃的台式恒温摇床中，培养 12h 获得种子细胞，用于发酵罐发酵。

（3）发酵培养

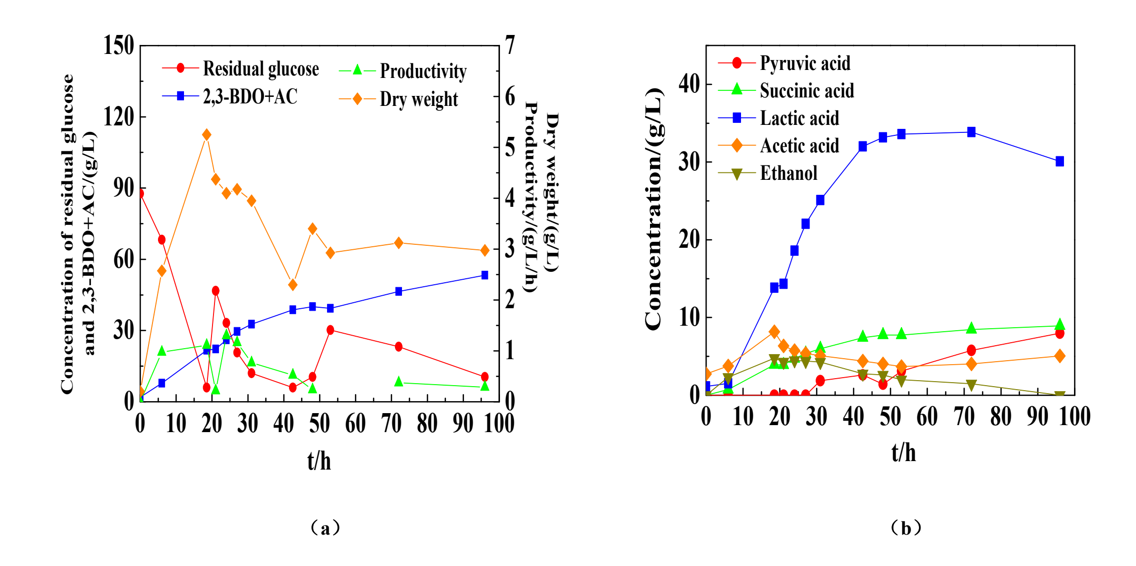
待（2）中种子培养完成后，以 10%接种量接入发酵罐中。在 37℃下，调节不同的通空气量、搅拌速度以及控制不同的 pH 值，考察菌种 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 产 2,3-丁二醇的发酵工艺。

1.3 分析方法

发酵液成分使用 HPLC 测定，以 Waters 2695 分离系统与 Waters 2414 示差检测器构成液相分析系统，其中分离柱选用 Aminex HPX-87H。以琥珀酸、乳酸、葡萄糖、乙酸、2,3-丁二醇、乙偶姻及乙醇等标准样品建立标准图谱，反应过程中定时测量反应体系中葡萄糖的消耗情况、产物 2,3-丁二醇以及主要副产物的积累情况。色谱条件为：流动相为 0.01 mol/L 的 H_2SO_4 超纯水溶液，流速为 0.5 mL/min，柱温设定为 60℃, 检测器温度为 40℃[13]。

2 结果与讨论

首先在通空气 1.0vvm、pH 控制 6.8 以及转速 200rpm 的条件下，采用菌种 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 在 15L 发酵罐中培养，发酵体积为 10L，对菌种 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 发酵产 2,3-丁二醇的情况进行初步考察，结果如图 1 所示：



（a）　　　　　　　　　　（b）

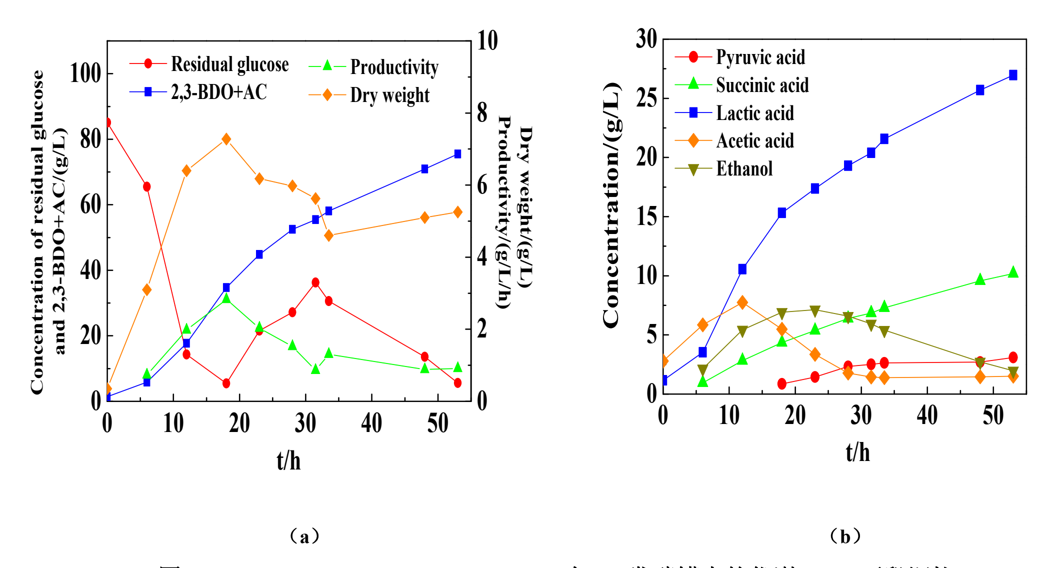
图 1 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 在 15L 发酵罐中的代谢

Fig.1 Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 in 15L fermentor

(a) Time-course of concentration of residual glucose and target product, productivity and dry weight under pH 6.8, aeration 1.0 vvm, agitation 200rpm.(b) Time-course of concentration of by-products under pH 6.8, aeration 1.0 vvm, agitation 200 rpm.

从发酵结果可知，在发酵条件下，菌种的目标产物 2,3-BDO 和乙偶姻的量，在 48h 为 40.0g/L。副产物主要是乳酸和琥珀酸。目标产物的选择性和生产速率分别为 0.321g/g 和 0.535g/(L•h)。初始底物在 18h 基本消耗完毕，补充底物继续培养，发酵 48h 后，底物的消耗速率变得迟缓。菌体干重在 18h 达到最大，达到 5.25g/L，其后菌体的量有所减少，并保持稳定。目标产物在菌种生长对数期和稳定期产率较高并保持稳定，48h 后迅速下降。延长发酵时间，目标产物的浓度有所增加，但增加的速率较缓慢，降低了目标产物整体的发酵效率。以上是菌种在 15L 发酵罐上产 2,3-丁二醇的基本情况。基于此，我们继续在 5L 发酵罐中改变不同的发酵条件，发酵体积为 2.5L，考察菌种发酵产 2,3-丁二醇的工艺。

据文献报道[8,9]，酸性环境有利于克雷伯氏菌发酵生成 2,3-BDO，因此我们考察了低 pH 条件下，菌种 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 的代谢，结果将发酵液 pH 控制为 6.5 时，发现菌种生长量极小，此时将 pH 调高，菌种经过较长时间的延滞期才开始重新生长，因此菌种本身在生长阶段并不适合低 pH 条件。由此，我们采用 pH 两段调控调节 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 的代谢，在生长阶段控制 pH 为 6.8，保持 12h，菌种的生物量基本稳定后，控制 pH 为 6.5 进行发酵，结果如图 2 所示：



（a）　　　　　　　　　　　　（b）

图 2 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 在 5L 发酵罐中的代谢，pH 两段调控

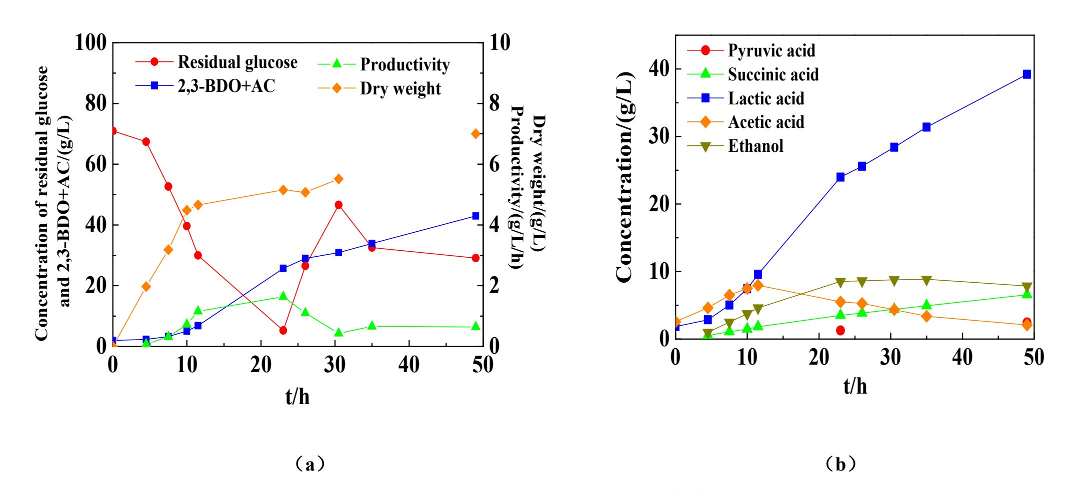
Fig.2 Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 in 5L fermentor, two-stage regulation of pH

(a) Time-course of concentration of residual glucose and target product, productivity and dry weight under pH 6.8 to 6.5, aeration 1.0 vvm, agitation 200rpm.(b) Time-course of concentration of by-products under pH 6.8 to 6.5, aeration 1.0 vvm, agitation 200 rpm

由发酵结果可知，在两段 pH 调控条件下，发酵 48h，目标产物的产量达到 70.9 g/L。同图一的条件相比，底物的消耗速率没有明显变化，但菌种的量迅速增加，比生长速率增大，18h 菌体干重达到 7.28g/L。目标产物在对数期和稳定期保持了较高的产率。同时，在同样条件下进行了三批平行试验，目标产物的产量分别达到 70.2g/L、73.1g/L 和 72.8g/L。其中，副产物中乳酸的量较高，菌体的干重也均超过了 6.5g/L。由此可知，在菌种的生长阶段，pH6.8 有利于菌体的生长，而在发酵阶段适当降低 pH 有利于目标产物的生成。

在以上研究的基础上，我们在 15L 发酵罐上，放大发酵体积，考察菌种 *K. pneumoniae* CICC 10011 在不同条件下发酵生产 2,3-丁二醇的代谢，从而确定 2,3-丁二醇的发酵工艺。

在 15L 发酵罐中，发酵体积 10L，我们采用 pH 两段调控调节 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 的代谢，在生长阶段控制 pH 为 6.8，保持 12h，菌种的生物量基本稳定后，控制 pH 为 6.5 转发酵，结果如图 3 所示：



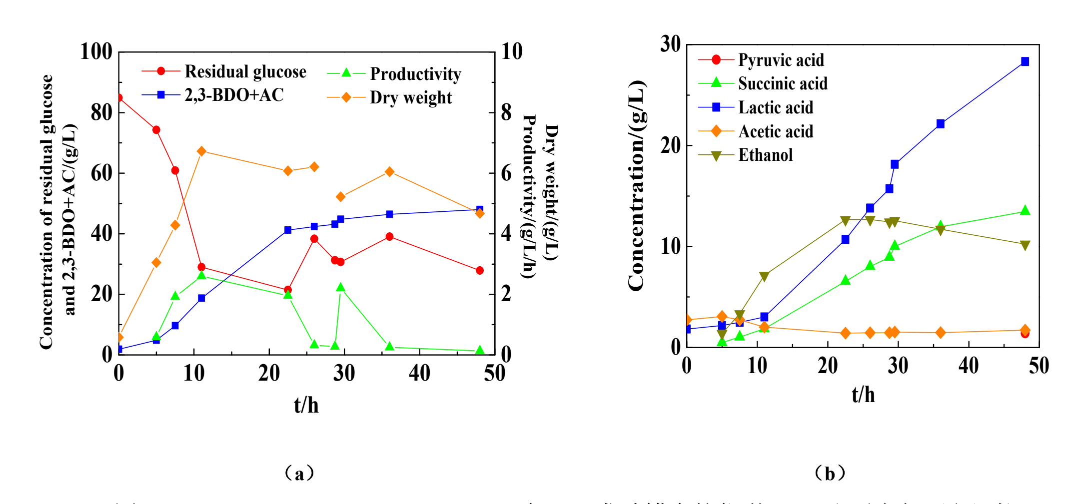
（a）　　　　　　　　　　　　（b）

图 3 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 在 15L 发酵罐中的代谢，pH 两段调控

Fig.3 Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 in 15L fermentor, two-stage regulation of pH

(a) Time-course of concentration of residual glucose and target product, productivity and dry weight under pH 6.8 to 6.5, aeration 1.0 vvm, agitation 200rpm.(b) Time-course of concentration of by-products under pH 6.8 to 6.5, aeration 1.0 vvm, agitation 200 rpm

由发酵结果可知，15L 发酵罐中底物消耗、目标产物生产以及菌体生长的速率和比速率均没有达到相同条件下 5L 发酵罐中的发酵水平。究其原因，虽然条件相同，但在 15L 发酵罐中发酵体积较大，同样的通气量和转速，发酵罐中的传质效率不如 5L 发酵罐，存在放大效应的影响。在此基础上，考察两段通气调控及两段 pH 调控对菌种代谢的影响，两段通气调控分别采用 1.0vvm 转 0.5vvm 和 0.5vvm 转 0.2vvm，两段 pH 调控分别采用 pH6.8 转 pH6.5 和 pH6.8 转 pH6.0，菌种代谢结果如图 4、图 5 和图 6 所示：

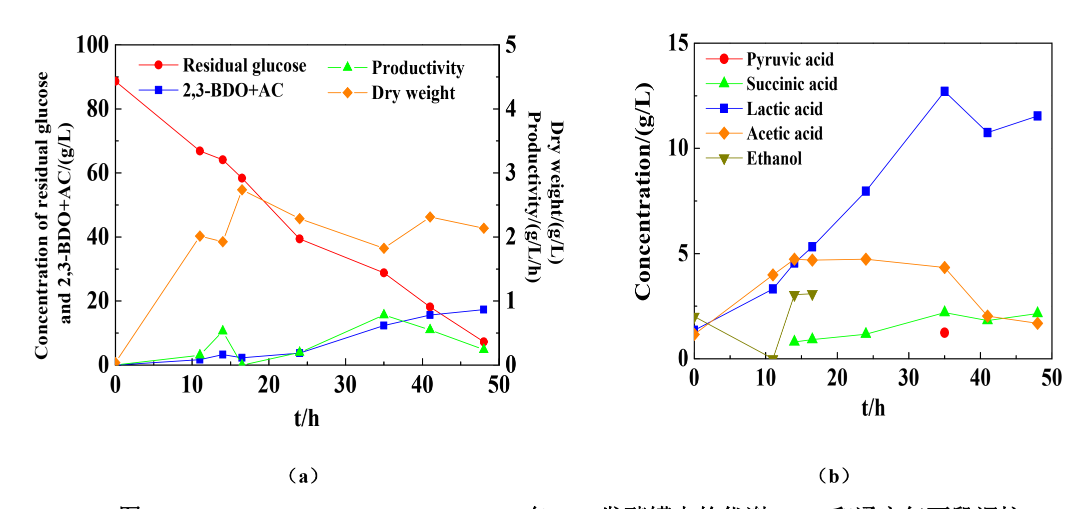


（a）　　　　　　　　　　　　（b）

图 4 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 在 15L 发酵罐中的代谢，pH 和通空气两段调控

Fig.4 Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 in 15L fermentor, two-stage regulation of pH and aeration

(a) Time-course of concentration of residual glucose and target product, productivity and dry weight under pH 6.8 to 6.5, aeration 1.0 vvm to 0.5vvm, agitation 200rpm.(b) Time-course of concentration of by-products under pH 6.8 to 6.5, aeration 1.0 vvm to 0.5vvm, agitation 200 rpm

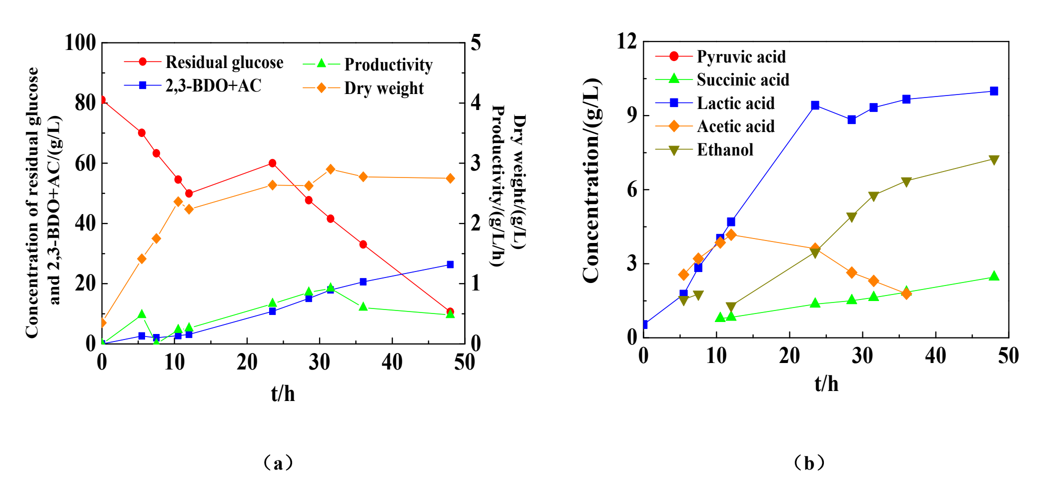


（a） （b）

图 5 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 在 15L 发酵罐中的代谢，pH 和通空气两段调控

Fig.5 Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 in 15L fermentor, two-stage regulation of pH and aeration

(a) Time-course of concentration of residual glucose and target product, productivity and dry weight under pH 6.8 to 6.5, aeration 0.5 vvm to 0.2vvm, agitation 200rpm.(b) Time-course of concentration of by-products under pH 6.8 to 6.5, aeration 0.5 vvm to 0.2vvm, agitation 200 rpm



（a） （b）

图 6 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 在 15L 发酵罐中的代谢，pH 和通空气两段调控

Fig.6 Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 in 15L fermentor, two-stage regulation of pH and aeration

(a) Time-course of concentration of residual glucose and target product, productivity and dry weight under pH 6.8 to 6.0, aeration 0.5 vvm to 0.2vvm, agitation 200rpm.(b) Time-course of concentration of by-products under pH 6.8 to 6.0, aeration 0.5 vvm to 0.2vvm, agitation 200 rpm

由结果可知，通空气 1.0vvm 转 0.5vvm 及 pH6.8 转 pH6.5 调控（图 4）相比 pH6.8 转 pH6.5，通空气 1.0vvm 的调控（图 3），目标产物生产和菌体生长的速率和比速率均增加，目标产物的量有所增加，副产物乳酸的量减少，说明在发酵阶段低氧条件有利于目标产物的生产。当两段通气的通气量范围改变为 0.5 vvm 转 0.2vvm（图 5），底物消耗、目标产物的生产以及菌体生长的速率和比速率均

减小，目标产物的量大幅度减少，菌体干重也明显减少，这是因为在菌种生长阶段由于通气量较少，只有 0.5vvm，导致菌种的有氧代谢不充分，菌种生长缓慢，从而影响了后续的发酵。研究者普遍认为 2,3-丁二醇是一种厌氧代谢产物[14]，但是在无氧条件下，细胞的生长速率过于缓慢，2,3-丁二醇的产率很低。在适当的低氧条件下，菌体的生长得到部分恢复，而代谢产生的大量 NADH 在 2,3-丁二醇脱氢酶的作用下还原 3-羟基-2-丁酮生成 2,3-丁二醇，最有利于其生产。氧气的浓度继续升高虽有利于菌体生长，但还原力将通过呼吸链传递给氧，在完全有氧时 2,3-丁二醇的产量最低。因此，在发酵过程中需要控制合理的氧气供给量，使 2,3-丁二醇的产量最大化。当继续改变两段 pH 调控的范围为 6.8 转 6.0，菌种的干重没有明显变化，但目标产物有所增加，说明发酵阶段低 pH 控制有利于目标产物的生成。

综合以上的代谢调控研究，对于菌种 *K. pneumoniae* CICC 10011，通过两段通气量，两段 pH，两段转速调控，考察菌种的代谢情况，其中在菌种生长阶段，通空气 1.0vvm，pH6.8，转速 400rpm，12h 后，进入发酵阶段，发酵条件为，通气 0.5vvm，pH6.0，转速 300rpm，菌种代谢结果如图 7 所示：

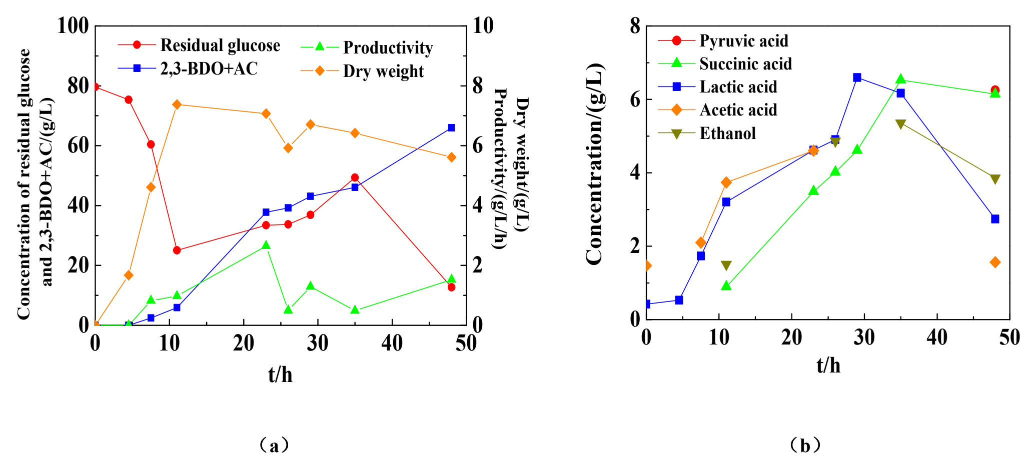


图 7 *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 在 15L 发酵罐中的代谢，pH、通空气和转速两段调控

Fig.7 Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* CICC10011 in 15L fermentor, two-stage regulation of pH、aeration and agitation

(a) Time-course of concentration of residual glucose and target product, productivity and dry weight under pH 6.8 to 6.0, aeration 1.0 vvm to 0.5vvm, agitation 400rpm to 300rpm.(b) Time-course of concentration of by-products under pH 6.8 to 6.0, aeration 1.0 vvm to 0.5vvm, agitation 400 rpm to 300rpm

由实验结果可知，在此条件下，底物消耗、菌体生长以及目标产物生产的速率均达到了较高的水准。菌种培养 48h 后，目标产物的浓度达到 66.0g/L，菌体

干重最高达到了 7.4g/L，而代谢过程中代谢副产物较少。发酵过程中菌种生长阶段搅拌速度的提高，改善了空气在发酵液中的传质，促进了菌体的生长，而在发酵阶段较低的 pH、通气量以及搅拌速度，有利于目标产物的生成，并抑制了代谢副产物的增加。

3 结论

在本实验中，首先对菌种 *K. pneumoniae* CICC 10011 发酵产 2,3-丁二醇的能力进行初步评价。然后，通过对发酵过程中通空气量、pH 以及转速条件的改变，考察菌种的发酵性能。发酵过程中，微氧条件有利于目标产物的代谢生成，但有氧条件更有利于菌种本身的生长，且微氧条件也有利于有机酸的生成，因此发酵工艺中通空气量和转速均可以采用两段调控，在菌种生长阶段采用较大的通空气量和转速，而在发酵阶段降低通气量和转速。目标产物 2,3-丁二醇本身偏碱性，因此，酸性条件有利于目标产物的生成，但酸性条件不利于菌种自身的生长，因此发酵过程采用两段 pH 调控，在菌种生长阶段采用较高的 pH 控制，转发酵之后降低 pH。最终，我们确定了菌种 *K. pneumoniae* CICC 10011 发酵产 2,3-丁二醇的工艺条件，在前 12h 菌种生长阶段，控制 pH 6.8，通空气量 1.0vvm，转速 400rpm，转发酵之后控制发酵条件为 pH 6.0，通空气量 0.5vvm，转速 300rpm。通过对菌种本身代谢特性的研究，确定菌种的发酵工艺条件，提高目标产物的产量，缩短发酵周期，为后续菌种的改造及工业应用的研究打下了初步的基础。

参考文献

[1] 戴建英, 孙亚琴, 孙丽慧等. 生物基化学品 2,3-丁二醇的研究进展. 过程工程学报, 2010, 10(1): 200-208.

Dai J Y, Sun Y Q, Sun L H, et al. Research progress of bio-based chemical 2,3-butanediol. The Chinese Journal of Process Engineering, 2010, 10(1): 200-208.

[2] 纪晓俊, 聂志奎, 黎志勇等. 生物制造 2,3-丁二醇：回顾与展望. 化学进展, 2010, 22(12): 2450-2461.

Jiao X J, Nie Z K, Li Z Y, et al. Biotechnological production of 2,3-Butanediol. Process In Chemistry, 2010, 22(12): 2450-2461.

[3] 宋源朝, 许赟珍, 李强等. 2,3-丁二醇的发酵生产. 化工进展, 2011, 30(5): 1069-1077.

Song Y Q, Xu Y Z, Li Q, et al. Fermentation of bio-based product 2,3-butanediol. Chemical Industry and Engineering Progress, 2011, 30(5): 1069-1077.

[4] 樊亚超, 张霖, 廖莎等. 2,3-丁二醇分离提取工艺研究进展. 化工进展, 2016, 35(8): 2323-2328.

Fan Y C, Zhang L, Liao S, et al. Progress on the separation of 2,3-butanediol. Chemical Industry and Engineering Progress, 2016, 35(8): 2323-2328.

[5] 张刚, 杨光, 李春等. 生物法生产 2,3-丁二醇研究进展. 中国生物工程杂志, 2008, 28(6): 133-140.

Zhang G, Yang G, Li C, et al. Research progress of 2,3-butanediol by biological method. China Biotechnology, 2008, 28(8): 133-140.

[6] Haren A, Walpole G S. 2,3-Butylene glycol fermentation by Aerobacter aerogenes. Proc Royal Soc B, 1906, 77: 399~405.

[7] 童颖佳, 邬文嘉, 彭辉等. 微生物合成 2,3-丁二醇的代谢工程. 化工学报, 2016, 67(7): 2656-2671.

Tong Y J, Wu W J, Peng H, et al. Metabolic engineering for efficient microbial production of 2,3-butanediol. CIESC Journal, 2016, 67(7):2656-2671.

[8] Garg S K. Jain A. Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. Bioresource Technol., 1995, 51: 103-109.

[9] Tran A V, Chambers R P. The dehydration of fermentative 2,3-butanediol into methyl ethyl ketone. Biotechnol. Bioent., 1987, 29(3): 343-351.

[10] Converti A, Perego P, Borghi A D. Effect of specific oxygen uptake rate on Enterobacter aerogenes energetics: carbon and reduction degree balances in batch cultivations. Biotechnol. Bioeng., 2003, 82:370-377.

[11] 韩宁宁, 肖冬光, 张翠英等. 木糖发酵生产 2,3-丁二醇条件的优化. 食品研究与开发, 2010, 31(11): 197-200.

Han N N, Xiao D G, Zhang C Y, et al. Optimization of fermentation conditions for 2,3-butanediol from xylose. Food Research and Development, 2010, 31(11): 197-200.

[12] 杜军, 纪晓俊, 黄和等. 产酸克雷伯氏杆菌发酵产 2,3-丁二醇的培养基优化. 生物加工过程, 2009, 7(1): 34-38.

Du J, Ji X J, Huang H, et al. Optimization of fermentation medium for production of 2,3-butanediol by Klebsiella oxytoca. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2009, 7(1): 34-38.

[13] Satoshi Fukuzaki, Yong-Jin Chang, Naomichi Nishio, et al. Characteristics of granular methanogenic sludge grown on lactate in a UASB eactor. Journal of Fermentation & Bioengineering, 1991, 72(6): 465-472.

[14] Celinska E, Grajek W. Biotechnological Production of 2,3-Butanedion- Current State and Prospects. Biotechnol. Adv., 2009, 27(6): 715-725.